

# Test précoce de la productivité chez le palmier à huile (*E. guineensis* Jacq.) par mesure des activités mitochondriales <sup>(1)</sup>

B. KOUAMÉ (2) et J. M. NOIRET (3)

**Résumé.** — Des croisements de 4 essais comparatifs dont les résultats sont connus ont été refaits. La phosphorylation oxydative des mitochondries isolées de graines germées et de plantules de ces croisements a été mesurée par polarographie. Les paramètres mitochondriaux obtenus sur plantules sont en bonne corrélation avec la production de régimes des croisements dans les essais en champs, mais on n'a pas trouvé de corrélation avec la production d'huile et les caractères végétatifs. Ces résultats permettent un tri au stade plantule des croisements les plus productifs en régimes et une application est envisagée pour les programmes d'amélioration et de production de semences ainsi que pour le choix des arbres à cloner par culture *in vitro*.

## I. — INTRODUCTION

La prédiction du potentiel de production d'un croisement est d'un intérêt évident pour l'amélioration des plantes et tout particulièrement dans le cas du palmier à huile pour lequel la réalisation des essais génétiques nécessite par descendance un demi-hectare pendant 10 ans et l'observation hebdomadaire durant 7 ans des 70 arbres qui y sont plantés.

Les interprétations biochimiques et physiologiques récentes de l'hétérosis [Hageman, 1967 ; Demarly, 1977], ainsi que des résultats intéressants obtenus par divers chercheurs concernant les activités oxydatives et phosphorylantes des mitochondries en liaison avec l'hétérosis [Doney *et al.*, 1972 ; Kridel, 1972 ; Mc Daniel, 1970, 1972, 1973 ; Mc Daniel *et al.*, 1968 ; Sarkissian *et al.*, 1969...], ont conduit l'I.R.H.O. à entreprendre des études sur ce sujet en 1974.

Les premières recherches ont permis de définir les conditions expérimentales de mesure des paramètres énergétiques mitochondriaux chez le palmier à huile et ont mis en évidence l'hétérosis mitochondrial chez cette plante [Kouamé, 1976]. Une liaison entre les activités mitochondriales et le rendement a pu ensuite être trouvée [Kouamé, 1978].

Les travaux, d'abord conduits en France, ont ensuite été effectués sur la Station de La Mé en Côte-d'Ivoire pour comparer le rendement de croisements, plantés dans des essais, aux activités de leurs mitochondries. Les mitochondries ont été isolées de racines prélevées en champ, puis de racines de graines germées et de plantules des mêmes croisements refaits pour ces études.

On se propose dans cette communication d'exposer les résultats obtenus dans différents essais, qui conduisent à la possibilité de trier à un stade jeune les croisements les plus productifs sur la base de l'efficacité de leurs mitochondries mesurée en laboratoire.

## II. — MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 1. — Matériel végétal.

On a choisi des croisements du premier cycle de sélection récurrente réciproque [Meunier et Gascon, 1972], plantés dans 4 essais comparatifs en Côte-d'Ivoire et au Cameroun, et pour lesquels les caractéristiques de production de régimes et d'huile sont connues. Ces croisements appartiennent à 3 types : Déli × La Mé, Déli × Yangambi et (Déli × La Mé) × Yangambi.

Les mitochondries ont été isolées de racines prélevées :

- sur les arbres des croisements en champ,
- sur les graines germées et les plants de préépinière (4 à 5 mois) des mêmes croisements qui ont pu être refaits. Tous les croisements des essais n'ont pu être refaits pour diverses raisons (mort de l'un des parents...).

Le matériel végétal utilisé est indiqué par essai dans le tableau I (cf. p. 534).

### 2. — Constitution des échantillons.

**En champ :** on prélève à environ 30 cm de profondeur et entre deux arbres du même croisement les 3 à 6 cm des extrémités apicales de racines primaires pour constituer un échantillon d'environ 10 g. Après lavage à l'eau distillée, chaque échantillon est conservé, dans un sac en plastique, au réfrigérateur pour être traité le lendemain.

**Sur graines germées et plants de préépinière.** Les graines des croisements qui ont été refaits sont mises à germer suivant la méthode habituelle [Comont *et al.*, 1977]. Lorsque les graines sont au stade « point blanc », on constitue deux lots par croisement :

- les graines du premier lot sont placées dans des caissettes et recouvertes de sacs de jute mouillés. Après deux semaines, les germes différenciés ont des racines de 2 à 5 cm de long que l'on prélève ; il faut de 100 à 150 graines germées pour obtenir un échantillon de 10 g ;
- les graines du second lot sont repiquées en préépinière ; 4 mois plus tard, on arrache 15 à 20 plantules par croisement pour former l'échantillon de 10 g environ d'apex racinaire.

(1) Communication présentée à la Conférence internationale « The oil palm in agriculture in the eighties », 17-20 juin 1981 à Kuala Lumpur (Malaisie).

(2) Service Sélection, Laboratoire de Biochimie. Station de La Mé, B.P. 13, Bingerville (Côte-d'Ivoire).

(3) Département Sélection de l'I.R.H.O. ; I.R.H.O./GERDAT, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

TABLEAU I. — Matériel végétal utilisé pour les mesures  
(Planting material used for measurements)

N° de l'essai (Trial No.)	Lieu de plantation (Planted in :)	Année de plantation (Year of planting)	Nombre de croisements (No. of crosses)	Dispositif (Design)	Essai comparatif en champ (Comparative trial in the field)		
					Nombre de croisements utilisés pour les mesures d'activités mitochondriales (No. of crosses used for measurements of mitochondrial activities)		
					En champ (In the field)	Sur graines germées (On germinated seeds)	Sur plantules de préépinière (On pre-nursery plants)
LM 61	Côte-d'Ivoire (Ivory Coast)	1961	9	sans (none)	8	6	9
LM-GP 8	Côte-d'Ivoire (Ivory Coast)	1967	20	6 blocs complets (1) (Compleat blocks)	20	13	14
LM-GP 9	Côte-d'Ivoire (Ivory Coast)	1968	24	6 blocs complets (1) (Compleat blocks)	24	9	13
MD-GP 1	Cameroun (Cameroon)	1968	25	12 blocs complets (1) (Compleat blocks)	non (no)	12	16

(1) La parcelle élémentaire comprend 8 arbres utiles (The elementary plot comprises 8 useful trees).

### 3. — Dispositif expérimental.

Dans les essais en champ, on a prélevé deux échantillons par parcelle expérimentale, soit  $2 \times 6$  répétitions = 12 échantillons par croisement. A partir de graines germées et de plantules, on a effectué le maximum de répétitions jusqu'à concurrence de 12, en fonction des disponibilités en matériel végétal, et trois croisements témoins ont été ajoutés pour relier les résultats des essais entre eux.

L'ordre de traitement des échantillons est tiré au sort par essai et le même manipulateur analyse un échantillon de chacun des croisements d'un essai dans la même journée.

### 4. — Isolement des mitochondries et mesure de leur activité.

Les mitochondries sont isolées de chaque échantillon de 10 g d'apex racinaire suivant la technique de Sarkissian et Srivastava [1968], adaptée au palmier à huile par Kouamé [1976, 1978].

La respiration des mitochondries, liée à la phosphorylation oxydative, est suivie par une méthode polarographique de mesure de l'oxygène avec une électrode de Clark. Pour chaque échantillon, on réalise 3 cycles de phosphorylation suivant la technique décrite par Kouamé [1978].

### 5. — Paramètres mitochondriaux.

L'interprétation des enregistrements est faite selon Chance et Williams [1955, 1956] et Estabrook [1967] pour déterminer les différents paramètres mitochondriaux [Kouamé, 1978].

Dans cette étude, on a seulement utilisé le rapport ADP/O (quantité d'oxygène consommée pour phosphoryler en ATP une quantité fixe d'ADP) qui caractérise l'efficacité des mitochondries.

Les autres paramètres ont également été calculés pour vérifier le bon état des mitochondries après leur isolement, mais les études précédentes avaient montré qu'ils ne permettaient pas de caractériser le fonctionnement spécifique des mitochondries d'un croisement.

## III. — RÉSULTATS

### 1. — Précision des mesures et des comparaisons.

Une mesure d'ADP/O est comprise entre 1,0 et 2,0 avec une précision de 0,1. Le coefficient de variation observé entre les différentes mesures d'un croisement est voisin de 10 p. 100.

L'analyse statistique des résultats des essais conclut en général à des différences entre croisements (Tabl. II) et le test de comparaison des moyennes (Duncan au seuil de 5 p. 100) montre qu'il est nécessaire que deux croisements aient des ADP/O qui diffèrent d'environ 10 p. 100 pour être significativement différents (Tabl. III). Il en est de même pour la production de régimes et d'huile des mêmes croisements comparés dans les essais en champ (Rapports d'Activités de l'I.R.H.O., 1974-1975 et 1976-1977).

### 2. — Relation entre activité mitochondriale et production des croisements.

Le tableau IV et la figure 1 résument les résultats des comparaisons entre les activités mitochondriales exprimées en ADP/O et la production de régimes et d'huile pour les croisements des 4 essais (cf. p. 536).

Les corrélations entre activités mitochondriales et production de régimes sont en général bonnes, alors qu'elles le sont plus rarement avec la production d'huile, que les mitochondries soient isolées de racines prélevées en champ ou de plantules des croisements refaits.

Sur graines germées, les résultats sont nettement moins bons, mais on doit noter que le nombre de déterminations a été faible car on a dû les limiter à 6 à cause des disponibilités en graines par croisement.

L'étude des résultats des croisements témoins (Tabl. V) montre qu'ils se classent toujours dans le même ordre. Ces croisements sont également plantés et celui pour lequel on obtient les ADP/O les plus élevés (D115D  $\times$  L2T) est le plus productif, les deux autres étant très voisins pour la production de régimes (D8D  $\times$  L9T et L37T  $\times$  D11D).

TABLEAU II. — Résultats de l'analyse statistique des mesures de l'activité mitochondriale pour les différents essais  
(Results of statistical analysis of mitochondrial activity measurements for the different trials)

Essai (Trial)	Mitochondries isolées de racines (Mitochondria isolated on roots)					
	En champ (In the field)		De graines germées (From germinated seeds)		De plantules (From seedlings)	
	F blocs (blocks)	F croisements (crosses)	F blocs (blocks)	F croisements (crosses)	F blocs (blocks)	F croisements (crosses)
LM 61	N S	20,02**	1,34	4,28**	4,19**	39,52**
LM-GP 8	N S	2,042*	N S	4,98**	N S	N S
LM-GP 9	4,26**	7,71**	N S	4,74**	1,97*	8,15**
MD-GP 1	—	—	N S	2,01*	7,27**	3,01**

TABLEAU III. — Comparaison des ADP/O de mitochondries isolées de plantules pour les croisements du LM-GP 9

(Comparison of ADP/O of the mitochondria isolated from seedlings for the crosses of LM-GP 9)

N° de classement du croisement (Cross classification N°)	ADP/O	Test de Duncan au seuil de 5 % (Duncan test at 5 % threshold)
1	1,72	> 7
2	1,66	> 7
3	1,66	> 7
4	1,62	> 10
5	1,61	> 12
6	1,60	> 12
7	1,54	> 15
8	1,52	> 15
9	1,52	> 15
10	1,50	> 15
11	1,50	> 15
12	1,47	> 16
13	1,42	
14	1,42	
15	1,38	
16	1,35	

### 3. — Relations entre activités mitochondriales et caractères végétatifs des croisements.

A partir des données de Hirsch [1980], on a calculé les corrélations entre différents caractères végétatifs et les activités mitochondriales pour les croisements des deux essais LM-GP 8 et LM-GP 9. Les résultats sont donnés dans le tableau VI.

On constate que les activités mitochondriales ne sont pas en relation avec la masse annuelle végétative produite et que, bien que la production de régimes représente de 40 à 50 p. 100 de la masse annuelle totale de matière sèche produite, on ne trouve pas de relation entre activité mitochondriale et production totale de matière sèche dans ces essais.

On observe une tendance à une relation inverse entre hauteur du stipe et activités mitochondriales. Cependant, dans les deux essais, on note déjà une relation inverse entre production de régimes et hauteur du stipe ( $r = -0,401$  et  $r = -0,641^{**}$  respectivement pour GP 8 et 9), sans que l'origine de cette relation puisse être attribuée au fait que dans ces essais les croisements appartiennent à deux types végétativement très différents (La Mé  $\times$  Déli et Yangambi  $\times$  Déli) car cette relation existe par exemple au sein des croisements La Mé  $\times$  Déli ( $r = 0,701^{*}$  et  $r = 0,757^{*}$  respectivement pour GP 8 et GP 9).

L'indice foliaire ne semble pas corrélatif avec les activités mitochondriales mais on observe une tendance à une relation avec l'indice de régimes et le taux d'assimilation nette, surtout dans l'essai GP 9.

### IV. — DISCUSSION

L'existence d'un fort effet d'hétérosis, aussi bien au niveau mitochondrial [Kouamé, 1978] que pour la production de régimes dans les croisements entre palmiers à huile génétiquement différents [Gascon et de Berchoux, 1964], peut expliquer qu'une bonne liaison existe entre ces deux caractères. Parallèlement, le fait que l'on ne constate pas d'effet d'hétérosis notable pour les composantes du taux d'extraction explique que l'on n'ait pu mettre en évidence de relation entre l'activité mitochondriale (ADP/O) et ce caractère.

On remarque d'ailleurs (tableau ci-dessous) que lorsque le paramètre ADP/O est significativement corrélatif avec la production d'huile, la variabilité du taux d'extraction entre croisements est faible et que, dans ce cas, la production d'huile est également étroitement reliée à la production de régimes :

	LM-GP 9 (24 croisements)	LM-GP 8 (20 croisements)
ADP/O (champ)		
— production d'huile	0,709***	0,311 NS
Production de régimes		
— production d'huile	0,837***	0,504*
C.V. du taux d'extraction (p. 100)	4,7	8,3
C.V. de la production de régimes (p. 100)	8,4	6,1

La production de régimes apparaît comme la résultante de l'efficacité de l'ensemble des réactions métaboliques, anaboliques et cataboliques, auxquelles les mitochondries

TABLEAU IV. — Corrélations entre la production et les activités mitochondriales  
pour des croisements plantés dans 4 essais  
(Correlations between production and mitochondrial activities for crosses planted in 4 trials)

Essai (Trial)	Caractères de production (Production characters)		ADP/O de mitochondries isolées de racines (ADP/O of mitochondria isolated from roots)					
			En champ (In the field)		De graines germées (Of germinated seeds)		De plantules (Of seedlings)	
			n(1)	r	n(1)	r	n(1)	r
LM 61	Production de régimes (Bunch production)	6- 9 ans (years)	8	0,854**	6	0,675 NS	9	0,984***
	Production d'huile (Oil yield)	6- 9 ans (years)	8	0,514 NS	6	0,627 NS	9	0,046 NS
LM-GP 8	Production de régimes (Bunch production)	6-12 ans (years)	20	0,663**	13	0,680*	14	0,694**
	Production d'huile (Oil yield)	6-12 ans (years)	20	0,311 NS	13	0,116 NS	14	0,072 NS
LM-GP 9	Production de régimes (Bunch production)	6-10 ans (years)	24	0,849***	9	0,713*	13	0,796**
	Production d'huile (Oil yield)	6-10 ans (years)	24	0,709***	9	0,544 NS	13	0,513 NS
MD-GP 1	Production de régimes (Bunch production)	6- 9 ans (years)	—	—	12	0,803**	16	0,833***
	Production d'huile (Oil yield)	6- 9 ans (years)	—	—	12	0,503 NS	16	0,529*

(1) Nombre de croisements (No. of crosses).

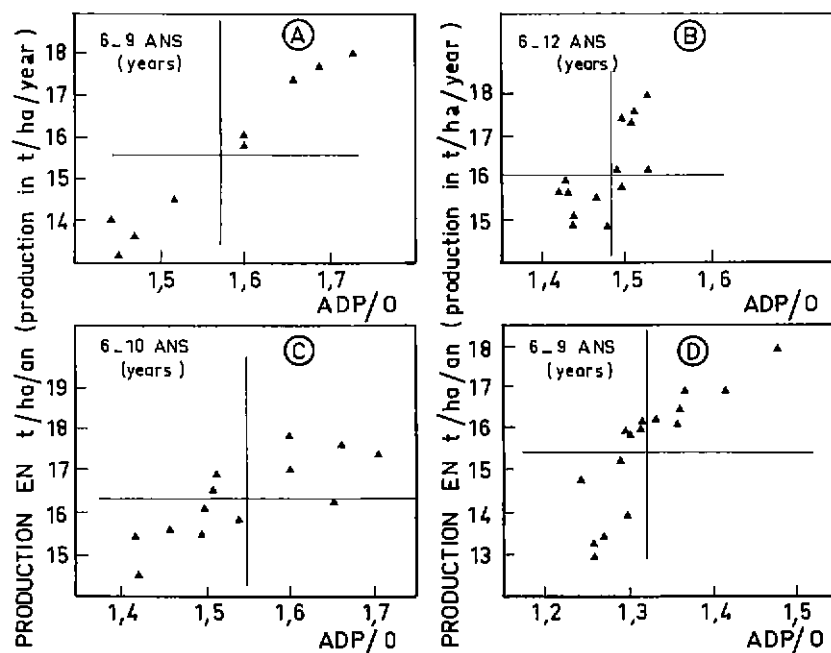


FIG. 1. — Relation entre la production de régimes de croisements et les activités (ADP/O) de leurs mitochondries au stade plantule de prépépinière.  
(Relationship between bunch production of the crosses and the activity — ADP/O — of their mitochondria in the pre-nursery seedling stage).

- (A) : Essai (Trial) LM 61 ( $r = 0,984^{***}$ ),  
 (B) : Essai (Trial) LM-GP8 ( $r = 0,694^{**}$ ),  
 (C) : Essai (Trial) LM-GP9 ( $r = 0,796^{**}$ ),  
 (D) : Essai (Trial) MD-GP1 ( $r = 0,833^{***}$ ).

TABLEAU V. — Résultats des croisements témoins  
(Results of control crosses)

Essai (Trial)	Matériel végétal pour les mesures (Planting material used for measurements)	ADP/O des témoins des mesures (of measurement controls)			Témoin en champ (Control in the field) L2T × D10D
		D115D × L2T	D8D × L9T	L37T × D11D	
LM 61	Graines germées (Germinated seeds)	1,695	1,320	1,413	—
LM-GP 8	Plantules (Seedlings)	1,545	1,463	1,472	—
LM-GP 9	Graines germées (Germinated seeds)	1,737	1,613	1,570	—
	Plantules (Seedlings)	1,623	1,382	1,351	1,657
MD-GP 1	Graines germées (Germinated seeds)	1,603	1,418	1,325	—
	Plantules (Seedlings)	1,436	1,246	1,274	1,478

TABLEAU VI. — Corrélations entre activités mitochondriales et caractères végétatifs (1)  
(Correlation between mitochondrial activities and vegetative characters) (1)

	LM-GP 8			LM-GP 9		
	Mitochondries isolées de racines prélevées : (Mitochondria isolated from roots taken :)			Mitochondries isolées de racines prélevées : (Mitochondria isolated from roots taken :)		
	en champ (in the field)	sur graines germées (on germinated seeds)	sur plantules (on seedlings)	en champ (in the field)	sur graines germées (on germinated seeds)	sur plantules (on seedlings)
Nombre de croisements (Number of crosses)	20	13	14	16	9	13
MAT Masse annuelle totale TAM (Total annual mass)	0,204	0,083	0,299	0,274	0,148	0,493
MAV Masse annuelle végétative AVM (Annual vegetative mass)	0,014	— 0,142	— 0,049	— 0,280	— 0,124	0,170
H Hauteur du stipe H (Height of stem)	— 0,293	— 0,581*	— 0,465	— 0,393	— 0,242	— 0,418
IF Indice foliaire LI (Leaf index)	— 0,150	— 0,459	— 0,093	— 0,532*	0,071	— 0,128
IR Indice de régimes BI (Bunch index)	0,230	0,215	0,309	0,653**	0,358	0,267
TAN Taux d'assimilation nette NAR (Net assimilation rate)	0,379	0,638*	0,398	0,754***	0,123	0,520*

(1) Caractères calculés par (Characters calculated by) Hirsch [1980] pour les 2 essais (for both trials).  
MAV (AVM) = Masse de feuilles + stipe + inflorescences mâles (poids sec) (Mass of leaves + stem + male inflorescences -dry weight).  
MAT (TAM) = MAV × production de régimes × 0,6 (AVM × bunch production × 0,6)

$$IR \quad (BI) = \frac{\text{Production de régimes en t/ha} \times 0,6}{MAT} \left( \frac{\text{Bunch production in tons/ha} \times 0,6}{TAM} \right)$$

$$TAN \quad (NAR) = \frac{MAT/ha}{IF/ha} \left( \frac{TAM/ha}{LI/ha} \right)$$

participent par leur métabolisme énergétique et dont elles sont un bon reflet chez le palmier à huile. L'activité mitochondriale ne suffit pas pour expliquer entièrement les différences de production entre croisements dans les essais : l'analyse de covariance effectuée à partir des mesures d'ADP/O au champ par parcelle élémentaire, et de la production de régimes de ces mêmes parcelles, montre qu'il y a encore des différences significatives entre croisements en tenant compte de la régression ADP/O-production.

Enfin, l'absence d'interaction notable génotype × environnement, constatée pour plusieurs essais plantés dans des écologies très différentes [Gascon *et al.*, 1981] avec des matériels variés, permet de considérer que les mêmes écarts relatifs existent entre les valeurs génotypiques des

croisements et entre leurs productions observées. C'est probablement pour cette raison que la liaison activité mitochondriale-rendement est aussi forte chez le palmier à huile contrairement à ce qui est observé chez d'autres plantes.

Les relations trouvées avec les caractères végétatifs demandent à être approfondies parce que leurs observations n'ont porté que sur une année et qu'ils sont fortement influencés par la climatologie. Ces relations semblent indiquer que ce sont les croisements, dont la production de régimes représente la plus grande part dans la matière sèche totale produite, qui ont la meilleure efficacité mitochondriale, et également que ces croisements ont la plus faible croissance en hauteur.



## V. — APPLICATION À LA SÉLECTION

Le niveau relativement élevé de la liaison entre l'activité mitochondriale (ADP/O) et la production de régimes rend possible la réalisation d'un tri précoce des matériels les plus productifs. Cependant, on doit tenir compte du fait que la relation entre ADP/O et production d'huile est faible et que l'objectif final est de sélectionner les matériels les plus productifs en huile. Pour cette raison, on distinguera 3 cas, selon que le test est appliqué à des croisements destinés à être comparés dans des essais pour le programme d'amélioration, à la production de semences, ou enfin à la recherche des meilleurs clones obtenus par culture de tissus *in vitro*.

### 1. — Application au programme d'amélioration.

Deux utilisations du test mitochondrial sont envisagées parallèlement aux essais comparatifs pour augmenter les chances de trouver des combinaisons intéressantes :

a) Dans le programme général d'amélioration basé sur un schéma de sélection récurrente réciproque, le test mitochondrial ne doit pas être trop discriminant pour éviter d'exclure des recombinaisons, des arbres donnant des croisements à production de régimes moyenne mais à fort taux d'extraction et présentant d'autres caractéristiques intéressantes (teneur élevée en acides gras insaturés, faible croissance en hauteur, résistance à certaines maladies...).

Parmi les croisements qui font l'objet de cette étude, certains ont été retenus pour un second cycle de sélection et on constate que leurs ADP/O sont en général voisins ou supérieurs à la moyenne de l'essai :

Essai		ADP/O		
		en champ	graines germées	plantules
LM-61	Moyenne	1,62	1,61	1,57
	L2T × L269D	1,74	1,61	1,69
	L2T × D10D	1,68	—	1,73
	L5T × L269D	—	—	1,60
LM-GP 8	Moyenne	1,77	1,73	1,48
	L411D × L319P	1,76	1,78	1,51
LM-GP 9	Moyenne	1,42	—	1,55
	L452T × UR 425/4	1,55	—	—
	L2T × D10D	1,53	—	1,66

b) Pour l'amélioration en second cycle des croisements choisis en fonction de leur production et de diverses caractéristiques, on aura intérêt en revanche à faire un choix sévère lors du test mitochondrial pour ne tester en champ que les croisements qui, *a priori*, doivent avoir une bonne production de régimes et rechercher ceux qui allient un fort taux d'extraction.

La variabilité au sein des croisements retenus à l'issue d'un premier cycle de sélection, est encore importante du fait de l'hétérozygotie des parents : la production des meilleurs arbres est de 50 à 60 p. 100 supérieure à la moyenne du croisement. En effectuant un grand nombre de croisements entre des arbres issus des autofécondations parentales, on peut espérer trouver des combinaisons égales à ces meilleurs arbres. Le test mitochondrial peut être effectué sur 100 à 150 croisements, desquels on retiendra seulement les 20 à 30 p. 100 des meilleurs pour être testés en champ, ce qui est pratiquement réalisable.

Dans les 4 essais de cette étude, un tri de 20 à 30 p. 100 des croisements ayant les meilleurs ADP/O conduit à

choisir ceux ayant la plus forte production de régimes, comme on peut le voir sur les figures 1-A à D.

### 2. — Application à la production de semences.

La production de semences de l'I.R.H.O. est basée sur la reproduction d'hybrides choisis à l'issue d'essais comparatifs en champ et reproduits par l'intermédiaire des autofécondations ou de combinaisons parentales [Gascon *et al.*, 1981]. Par exemple, pour reproduire D1 × T1, on utilisera 40 dura de l'autofécondation de D1 croisés au hasard avec 40 pisifera de l'autofécondation de T1. On sait qu'en moyenne la population de croisements obtenue aura les mêmes caractéristiques que les tenera de D1 × T1 [Jacquemard *et al.*, 1981].

Le nombre des combinaisons entre les 40 dura de l'AF de D1 et les 40 pisifera de l'AF de T1 étant trop important pour qu'on les teste toutes, on réalisera le test mitochondrial de 3 croisements par dura et par pisifera suivant un schéma diallèle incomplet (120 croisements au total) et on retiendra la moitié des dura et des pisifera donnant en moyenne les meilleurs ADP/O.

### 3. — Application à la recherche de bons clones.

Les arbres que l'I.R.H.O. a commencé de cloner par culture de tissu foliaire *in vitro* sont choisis dans les meilleurs hybrides des essais comparatifs, mais on n'est jamais certain d'avoir retenu les meilleurs car les caractères observés sont les résultantes d'interactions entre la valeur génétique qui se retrouvera bien dans le clone et l'environnement qui varie d'un arbre à l'autre.

Parmi les composantes du rendement en huile, le taux d'extraction peut être connu avec précision en analysant de nombreux régimes. La production de régimes est en général observée sur au moins 6 ans mais elle est très influencée par l'environnement et peut être confirmée par un test mitochondrial à 2 niveaux :

— sur l'arbre lui-même en effectuant des prélèvements racinaires,

— sur le clone qui en est issu, au stade plantule.

Des essais, dans lesquels on compare la production et les activités mitochondriales d'arbres au sein d'une descendance, sont en cours pour la mise au point du test.

## VI. — RÉALISATION DU TEST

### 1. — Matériel végétal.

On a intérêt à isoler les mitochondries d'apex racinaires de plantules âgées de 4 mois afin de disposer de suffisamment de matériel végétal par croisement pour effectuer une douzaine de répétitions. Sur germes de graines germées, il faut en effet 100 à 150 graines germées par mesure alors que, sur apex racinaires de plantules, 20 sont suffisantes.

Par croisement, on mettra 400 graines en germe pour obtenir 240 plantules normales à 4 mois.

### 2. — Mesures.

Pour un échantillon, il faut en moyenne 15 min pour isoler les mitochondries et 15 min pour mesurer leur activité. Dans un laboratoire comprenant 1 biochimiste,

2 techniciens et 4 aides, on peut tester chaque année 600 croisements. L'investissement pour un tel laboratoire représente 90 m<sup>2</sup> de construction et de l'ordre de 150 000 FF (en 1981) d'équipements ; son fonctionnement pour tester 600 croisements nécessite environ 60 000 F par an de produits et matériels divers.

### CONCLUSION

La bonne relation trouvée entre les activités mitochondriales, à des stades juvéniles, et la production de régimes en champ pour des croisements rend possible la réalisation d'un test précoce sur ce caractère chez le palmier à huile.

Ce résultat ouvre des perspectives nouvelles à l'amélioration

car les essais comparatifs, indispensables pour rechercher les bonnes aptitudes à la combinaison, sont coûteux sur une plante pérenne à fort encombrement et nécessairement limités par des motifs économiques.

Le tri précoce des croisements ayant une forte production de régimes augmentera les chances de trouver des croisements à forte production en huile dans les essais comparatifs en champ et améliorera l'efficacité de la sélection.

L'application de ce test à la recherche des arbres à cloner devrait également conduire à une mise en évidence plus rapide de bons clones tout en augmentant les chances d'en trouver d'exceptionnels.

### REFERENCES

- CHANCE B., WILLIAMS R. G. (1955). — A simple and rapid assay on oxydative phosphorylation. *Nature*, 175, p. 1120.
- CHANCE B., WILLIAMS R. G. (1955). — Respiratory enzymes in oxydative phosphorylation. I. — Kinetics of oxygen utilisation. I. — *Biol. Chem.*, 193, p. 383-393.
- CHANCE B., WILLIAMS R. G. (1956). — The respiratory chain and oxydative phosphorylation. *Adv. Enzymol.*, 17, p. 65-134.
- COMONT G., JACQUEMARD J. C. (1977). — Germination des graines de palmier à huile en sacs de polyéthylène. Méthode par « chaleur sèche ». *Oléagineux*, 32, N° 4, p. 149-154 (Conseils de l'I.R.H.O. N° 171, trilingue fr.-angl.-esp.).
- DEMARLY Y. (1977). — *Génétique et Amélioration des plantes*. Ed. Masson, Paris, France.
- DONEY D. L., THEURER J. C., WYSE R. E. (1972). — Mitochondrial complementation in sugar beet. *Crop Sci.*, 12, p. 190-191.
- ESTABROOK R. W. (1967). — Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. *Methods Enzymol.*, 10, p. 41-47.
- GASCON J. P., JACQUEMARD J. C., HOUSOU M., BOUTIN D., CHAILLARD H., KANGA FONDJO F. (1981). — La production de semences sélectionnées de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) (trilingue fr.-angl.-esp.). *Oléagineux*, 36, N° 10, p. 475-486.
- GASCON J. P., de BERCHOUX C. (1964). — Caractéristiques de la production d'un croisement d'*Elaeis guineensis* Jacq. de diverses origines et de leurs croisements. *Oléagineux*, 19, N° 2, p. 75-84.
- HAGEMAN R. H., LENG E. R., DUBLEY J. W. (1976). — A biochemical approach to corn breeding. *Adv. Agron.*, 19, p. 45-86.
- HIRSCH J. P. (1980). — Relation entre l'appareil végétatif et la production chez le palmier à huile en Côte-d'Ivoire (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 35, N° 5, p. 233-239.
- JACQUEMARD J. C., MEUNIER J., BONNOT F. (1981). — Etude génétique de la reproduction d'un croisement chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 36, N° 7, p. 343-352.
- KOUAME B. (1976). — *Bases biochimiques de l'hétérosis mitochondrial chez le palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.)* — Thèse Doctorat 3<sup>e</sup> cycle, Université Paris-Sud (Orsay).
- KOUAME B. (1978). — Mesure des activités mitochondriales chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Mise en évidence de l'hétérosis mitochondrial et comparaison des activités mitochondriales de plusieurs hybrides (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 33, N° 6, p. 267-273.
- KRIDEI D. I. (1972). — *Mitochondrial complementation and heterosis in Pisum sativum*. L.M.S. Thesis, Univ. of Arizona, Tucson, U.S.A.
- Mc DANIEL R. G. (1970). — Mitochondrial heterosis in barley. *Proc. 2nd Int. Barley Genetics Symp.*, 1970, p. 327-337.
- Mc DANIEL R. A. (1972). — Mitochondrial heterosis and complementation as biochemical measures of yield. *Nature New Biology*, 236, p. 190-191.
- Mc DANIEL R. G. (1973). — Genetics factors influencing seed vigor : biochemistry of heterosis. *Seed Sci. Techn.*, 1, p. 25-50.
- Mc DANIEL R. G., SARKISSIAN I. V. (1968). — Mitochondrial heterosis in maize. *Genetics*, 59, N° 4, p. 465-475.
- MEUNIER J., GASCON J. P. (1972). — Le schéma général d'amélioration du palmier à huile à l'I.R.H.O. (bilingue fr.-angl.). *Oléagineux*, 27, N° 1, p. 1-12.
- SARKISSIAN I. V., SRIVASTAVA H. K. (1968). — On methods of isolation of active, tightly coupled mitochondria of wheat seedlings. *Plant Physiol.*, 43, N° 9, p. 1406-1410.
- SARKISSIAN I. V., SRIVASTAVA H. K. (1969). — High efficiency, heterosis and homeostasis in mitochondria of wheat. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 63, p. 302-309.

### SUMMARY

A precocious test for productivity in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by measurement of mitochondrial activities.

B. KOUAMÉ, J. M. NOIRET, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 11, p. 533-542.

Crosses in four comparative trials of which the results are known were made again. The oxidative phosphorylation of the mitochondria isolated from germinated seeds and seedlings of these crosses was measured by polarography. The mitochondrial parameters obtained on seedlings are in good correlation with bunch production of the crosses in the field trials, but no correlation was found with oil yield and vegetative characters. These results allow the crosses most productive in bunches to be sorted out at the seedling stage, and an application is contemplated for the improvement and seed production programmes as well as for the choice of trees to be cloned by *in vitro* culture.

### RESUMEN

Prueba temprana de productividad en la palma africana (*E. guineensis* Jacq.) por medida de las actividades de mitocondrias.

B. KOUAMÉ, J. M. NOIRET, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 11, p. 533-542.

Se repitió cruzamientos de 4 pruebas comparativas cuyos resultados están conocidos. Se midió por polarografía la fosforilación oxidativa de mitocondrias aisladas de semillas germinadas y de plántulas de estos cruzamientos. Los parámetros de mitocondrias logrados en plántulas muestran una buena correlación con la producción de racimos de los cruzamientos en las pruebas de campo, pero no se encontró ninguna correlación con la producción de aceite y los caracteres vegetativos. Estos resultados permiten una selección en la fase de plántula de los cruzamientos más productivos de racimos, y se considera una aplicación para los programas de mejora y de producción de semillas, así como para la elección de los árboles a clonarse por cultivo *in vitro*.

# A precocious test for productivity in the oil palm (*E. guineensis* Jacq.) by measurement of mitochondrial activities (1)

B. KOUAMÉ (2) and J. M. NOIRET (3)

## I. — INTRODUCTION

The prediction of the yield potential of a cross is of obvious interest in plant improvement, and most particularly in the case of oil palm, for which genetic trials require 1/2 ha per progeny for 10 years and weekly observation for 7 of the 70 trees planted on it.

The recent biochemical and physiological interpretations of heterosis [Hageman, 1967; Demarly, 1977], as well as the interesting results obtained by various researchers as regards the oxidizing and phosphorylating activities of the mitochondria in liaison with heterosis [Doney *et al.*, 1972; Kridel, 1972; Mc Daniel, 1970, 1972, 1973; Mc Daniel *et al.*, 1968; Sarkissian *et al.*, 1969...] led the I.R.H.O. to undertake studies on this subject in 1974.

The first research helped to define the experimental conditions in which the mitochondrial energy parameters in the oil palm should be measured, and showed that mitochondrial heterosis took place in this plant [Kouame, 1976]. Later, it was possible to find a connection between mitochondrial activities and yield [Kouamé, 1978].

Started in France, research continued thereafter on the La Me Station, Ivory Coast, to compare the yield of crosses planted in the trials with their mitochondrial activities. The mitochondria were isolated on roots sampled in the field, then on roots of germinated seeds and seedlings of the same crosses made again for the studies.

In this communication it is proposed to explain the results obtained in the different trials, which have opened up the possibility of sorting out the most productive crosses at a very early stage on the basis of the efficacy of their mitochondria measured in the laboratory.

## II. — MATERIAL AND METHOD

### 1. — Planting Material

The crosses chosen came from the first cycle of recurrent reciprocal selection [Meunier and Gascon, 1972], planted in 4 comparative trials in the Ivory Coast and Cameroon, and whose yield, bunch and oil characteristics are known. These crosses belong to 3 types: Deli × La Me, Deli × Yangambi and (Deli × La Me) × Yangambi.

The mitochondria were isolated on roots:

- of trees of these crosses in the field,
- of germinated seeds and pre-nursery plants (4-5 months) of such of the same crosses which could be made again. Not all could be made, for various reasons (death of one of the parents, etc...).

The planting material used is given in Table I for each trial.

### 2. — Making up samples.

**In the field:** At a depth of about 30 cm, and between 2 trees of the same cross, 3-6 cm of the apical tips of primary roots are taken to make up a sample of approximately 10 g. After washing in distilled water, each sample is kept in a plastic bag in the refrigerator to be treated next day.

**On germinated seeds and pre-nursery plants.** Seeds of the crosses which have been made anew are set to germinate by the normal method [Comont *et al.*, 1977]. When the seeds are at the « white point » stage, 2 lots per cross are made up:

— the seeds of the first lot are placed in small boxes and covered with damp jute bags. After 2 weeks the differentiated sprouts have roots 2-5 cm long which are removed; it takes 100-150 germinated seeds to make a 10-g sample;

— the seeds of the second lot are pricked out in the pre-nursery; 4 months later, 15-20 seedlings per cross are pulled up to provide about 10 g of root apex.

### 3. — Experimental design.

On the field trials, 2 samples were taken in each experimental plot, i.e. 2 × 6 replications = 12 samples per cross. With the germinated seeds and seedlings as many replications as possible were done depending on the planting material available, up to a maximum of 12; 3 control crosses were added to link the trial results together.

### 4. — Isolation of mitochondria and measurement of their activity.

The mitochondria are isolated on each 10-g sample of root apex by the Sarkissian and Srivastava method [1968] adapted to oil palm by Kouamé [1976, 1978].

Respiration of the mitochondria connected with oxidizing phosphorylation is followed by a polarographic method of oxygen measurement with a Clark electrode. For each sample, 3 phosphorylation cycles are carried out according to the technique described by Kouamé [1978].

### 5. — Mitochondrial parameters

Interpretation of the readings is made according to Chance and Williams [1955, 1966] and Estabrook [1967] to determine the different mitochondrial parameters [Kouamé, 1978].

In this study we used only the ADP/O ratio (quantity of oxygen consumed to phosphorylate in ATP a fixed quantity of ADP), which characterizes the efficiency of the mitochondria.

The other parameters were also calculated to check the good condition of the mitochondria after their isolation, but previous studies had shown that they did not make it possible to characterize the specific function of mitochondria of a cross.

## III. — RESULTS

### 1. — Precision of measurement and comparisons.

An ADP/O measurement lies between 1.0 and 2.0, with a precision of 0.1. The coefficient of variation observed between the different measurements of a cross is close to 10 p. 100.

Statistical analysis of the trial results in general concludes that there are differences between crosses (Tabl. II) and the means comparison test (Duncan at the 5 p. 100 threshold) shows that 2 crosses must have ADP/O's differing by about 10 p. 100 to be significantly different (Tabl. III). The same applies to the bunch and oil yield of the same crosses compared in the field trials (I.R.H.O. Annual Reports, 1974-1975 and 1976-1977).

### 2. — Relationship between mitochondrial activity and yield of the crosses.

Table IV and Figure 1 summarize the results of comparisons between mitochondrial activities expressed in ADP/O and oil on bunch yield of the crosses in the 4 trials.

Correlations between mitochondrial activities and bunch production are usually good, whereas they are more rarely so with oil yield, whether the mitochondria are isolated from roots sampled in the field or on seedlings from crosses made *afresh*.

On germinated seeds, the results are not nearly so good, but it should be noted that there were few determinations, which had to be limited to 6 because of the number of seeds available per cross.

(1) Communication presented to International Conference « The Oil palm in agriculture in the eighties », 1981, 17-20 June, Kuala Lumpur (Malaysia).

(2) Plant Breeding Service, Biochemical Laboratory, La Me Station, B.P. 13, Bingerville (Ivory Coast).

(3) I.R.H.O. Plant Breeding Dept. I.R.H.O./GERDAT, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).



Examination of the results of the control crosses (Table V) shows that they are always classed in the same order. These crosses have also been planted, and the one with the highest, (ADP/O D115D × L2T) is the best yielder, the 2 others being close to each other for bunch production (D8D × L9T and L37T × D11D).

### 3. — Relationship between mitochondrial activities and vegetative characters of the crosses.

On the basis of Hirsch's data [1980], calculation was made of the correlations between the different vegetative characters and mitochondrial activities for the crosses of both trials, LM-GP 8 and LM-GP 9. The results given in Table VI.

It is found that there is no relationship between mitochondrial activities and the vegetative mass produced annually, and that although bunch yield represents 40-50 p. 100 of annual dry matter production, there is no relationship between mitochondrial activity and total dry matter production in these trials.

There is a tendency towards an inverse relationship between height of stem and mitochondrial activities. However, in both trials we already note an inverse relationship between bunch yield and stem height ( $r = 0.401$  and  $r = 0.641^{**}$  respectively for GP 8 and 9), without it being possible to attribute its origin to the fact that the crosses in the trials belong to 2 very different vegetative types (La Me and Deli and Yangambi and Deli), as it exists, for example, within La Me and Deli crosses ( $r = 0.701^{*}$  and  $r = 0.757^{*}$  for GP 8 and 9 respectively).

The leaf index does not seem to correlate with mitochondrial activities, but there tends to be a relationship with bunch index and net assimilation rate, especially in trial GP 9.

## IV. — DISCUSSION

The existence of a strong effect of heterosis both at mitochondrial level [Kouamé, 1978] and in bunch yield in crosses between genetically different oil palms [Gascon and de Berchoux, 1964] may explain why there is a good relationship between these two characters. At the same time, the fact that there is marked effect of heterosis insofar as the components of the extraction rate are concerned explains why no relationship between mitochondrial activity (ADP/O) and this character could be brought to light.

In other respects (see Table below) we note that when the parameter ADP/O is in significant correlation with oil yield, the extraction rate varies little between crosses, and that in this case oil yield is also closely related to bunch production :

	LM-GP 9 (24 crosses)	LM-GP 8 (20 crosses)
ADP/O (field) — Oil yield .....	0.709 ***	0.311 NS
Bunch production — Oil yield .....	0.837 ***	0.504 *
C.V. of extraction rate (p. 100) .....	4.7	8.3
C.V. of bunch production (p. 100) ....	8.4	6.1

Bunch production appears as the result of the efficiency of the metabolic, anabolic and catabolic reactions, in which the mitochondria participate through their energy metabolism, and of which they are a good reflection in the oil palm. Mitochondrial activity does not completely explain differences in yield between crosses in the trials : analysis of the covariance based on ADP/O measurements in the field by elementary plot as well as in the bunch production of these same plots shows that there are still significant differences between crosses, taking into account the ADP/O — production regression.

Finally, the absence of a notable genotype × environment interaction in several trials planted in very different ecologies [Gascon *et al.*, 1981] with varied material allows it to be thought that the are the same relative deviations between the genotype values of the crosses as between their observed yields. It is probably for this reason that the mitochondrial activity-yield link is so strong in the oil palm, contrary to what is observed in other plants.

The relationships with vegetative characters which have been found need to be studied more thoroughly, as observations were only made for one year and were strongly influenced by climate. These relationships seem to indicate that it is the crosses in which bunch production occupies the largest proportion of total dry matter produced which have the best mitochondrial activity, and also that these crosses have the smallest heightwise growth.

## V. — APPLICATION TO PLANT BREEDING

The relatively high level of the link between mitochondrial activity (ADP/O) and bunch yield makes it possible to sort out the most productive material at a very early stage. However, it must be borne in mind that the ADP/O — oil yield relationship is weak and that the goal is to select material with the highest oil yield. For this reason, we will make a distinction between 3 cases, according to whether the test is applied to crosses intended to be compared in trials for the improvement programme, or for seed production, or, again, for research for the best clones obtained by *in vitro* tissue culture.

### 1. — Application to the improvement programme.

There are two possible uses of the mitochondrial test in parallel with the comparative trials to increase the chances of finding interesting combinations :

a) In the general improvement programme based on a recurrent reciprocal selection plan, the mitochondrial test should not be too discriminatory, to avoid excluding from the recombinations trees giving crosses with medium bunch production but a high extraction rate and having other interesting characteristics (high unsaturated fatty acid content, slow vertical growth, resistance to certain diseases, etc.).

Amongst the crosses studied here, certain were chosen for a second selection cycle, and it is noted that their ADP/O is usually close to or higher than the mean for the trial :

		ADP/O		
Trials		in the field	germinated seeds	seedlings
LM-61	Mean	1.62	1.61	1.57
	L2T × L269D	1.74	1.61	1.69
	L2T × D10D	1.68	—	1.73
	L5T × L269D	—	—	1.60
LM-GP 8	Mean	1.77	1.73	1.48
	L411D × L319P	1.76	1.78	1.51
LM-GP 9	Mean	1.42	—	1.55
	L452T × UR 425/4	1.55	—	—
	L2T × D10D	1.53	—	1.66

b) On the contrary for the second-cycle improvement of the crosses chosen in function of their yield and various other characteristics, there is every advantage in making a strict choice on the mitochondrial activities so as to test in the field only those crosses *a priori* likely to have a good bunch yield and to seek those which have a high extraction rate as well.

Variability within the crosses retained at the end of the first selection cycle is still considerable because of the heterozygosis of the parents : yield of the best trees if 50-60 p. 100 higher than the mean for the cross. By making a large number of crosses between trees issuing from parental selfings, it can be hoped that combinations equal to these best trees will be found. The mitochondrial test can be carried out on 100-150 crosses, of which only 20-30 p. 100 of the best will be retained for testing in the field, which is possible in practice.

In the 4 trials of this study, sorting out of the 20-30 p. 100 of the crosses with the best ADP/O leads to the choice of those with the highest bunch production, as will be seen in Figure 1, A-D.

### 2. — Application to seed production.

I.R.H.O. seed production is based on the reproduction of hybrids chosen in the comparative hybrid field trials and reproduced through selfings or parental combinations [Gascon *et al.*, 1981]. For example, to reproduce D1 × T1, 40 dura of the self of D1 crossed at random with 40 pisifera of the self of T1. It is known that on an average the population of crosses obtained will have the same characteristics as the tenera of D1 × T1 [Jacquemard *et al.*, 1981].

The combinations between the 40 dura of the D1 self and the 40 pisifera of the T1 self are too numerous for them all to be tested, so the mitochondrial test will be applied to 3 crosses per dura and per pisifera according to an incomplete diallel plan (120 crosses in all), and half the dura and pisifera giving with the best ADP/O on average will be retained.

### 3. — Application to research for good clones.

The trees which the I.R.H.O. has started cloning by *in vitro* tissue culture are chosen from the best hybrids in the comparative trials, but it is never certain that the very best have been selected, as the characters observed result from interactions between genetic value, which will be found again in the clone, and environment, which varies from tree to tree.

Amongst the oil yield components, extraction rate can be found out exactly by analysing numerous bunches. Bunch yield is usually observed for at least 6 years, but it is greatly influenced by environment and can be confirmed by a mitochondrial test at 2 levels :

- on the tree itself, by root samples,
- on the clone derived from the tree, at the plantlet stage.

Trials in which yield and mitochondrial activities of trees from one progeny are compared are now going on so that a test can be worked out.

## VI. — CARRYING OUT THE TEST

### 1. — Planting material.

It is preferable to isolate the mitochondria from the root apices of 4-month-old seedlings, so as to have sufficient planting material in hand for each cross to make about 12 replications. In effect, with sprouts of germinated seeds it takes 100-150 seeds per measurement, whereas with root apices, 20 seedlings suffice.

400 seeds per cross are placed in germination to give 240 normal seedlings at 4 months.

### 2. — Measurements.

For one sample, it takes an average 15 minutes to isolate the mitochondria and 15 minutes to measure their activity. In a laboratory with 1 biochemist, 2 technicians and 4 assistants, 600 crosses can be tested each year. The investment for such a laboratory is 90 m<sup>2</sup> of building and about 150,000 French francs (in 1981) for equipment ; its operation for the testing of 600 crosses will costs roughly 60,000 francs/year in products and miscellaneous equipment.

## CONCLUSION

The close relationship between mitochondrial activity at an early age and bunch production in the field makes it possible to apply a precocious test for this character in the oil palm.

This finding opens new prospects for improvement, as comparative trials, indispensable to the search for good combining abilities, are costly with a bulky, perennial plant, and of necessity limited by economic considerations.

The early selection of crosses with high bunch production will increase the chance of finding crosses with a big oil yield in comparative trials in the field, and will improve the efficiency of plant breeding.

The application of this test to research for trees to be cloned should also enable good clones to be singled out much earlier, whilst enhancing the possibility of finding exceptional ones.

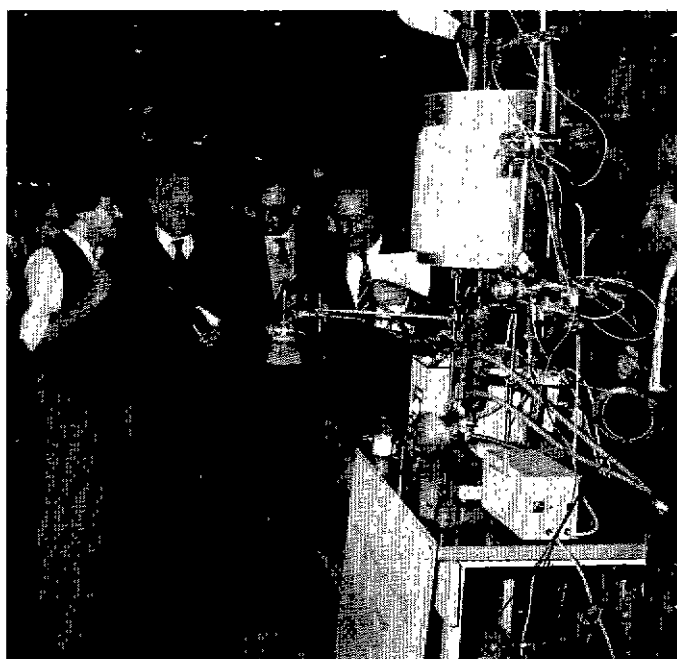


## Congrès, Salons, Expositions

### « Le SITEF 1981 »

A l'occasion du premier Salon International des Techniques et Energies du Futur (SITEF), qui s'est tenu du 20 au 25 Octobre 1981 à Toulouse (France), l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (I.R.H.O.) a présenté un réacteur de laboratoire permettant la conversion catalytique de sous-produits d'huiles végétales en essence.

Cet appareil dont on peut voir la photo ci-contre a suscité un vif intérêt de la part des visiteurs du Salon.



Monsieur Savary, Ministre de l'Éducation nationale et Monsieur Raymond, Président du Conseil Régional Midi-Pyrénées devant le réacteur de l'I.R.H.O. au SITEF.